



**Espacenet**

## **Bibliographic data: DE 3827477 (A1)**

**Process for the isolation and cultivation alone of human corneal endothelial cells (HCEC)**

**Publication date:** 1990-02-22  
**Inventor(s):** FRIEDL PETER DR [DE]; ENGELMANN KATRIN DR [DE] +  
**Applicant(s):** BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH [DE] +  
**Classification:**  
     - **international:** **C12N5/071**; (IPC1-7): B01D15/08; B01D61/00; C12N5/00; C12N9/64  
     - **European:** C12N5/06B8C  
**Application number:** DE19883827477 19880812  
**Priority number(s):** DE19883827477 19880812

### **Abstract of DE 3827477 (A1)**

The invention relates to a process for the isolation and cultivation alone of human corneal endothelial cells (HCEC).

Last updated: 26.04.2011    Worldwide Database    5.7.23; 92p

18 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
11 DE 3827477 A1

21 Aktenzeichen: P 38 27 477.9  
22 Anmeldetag: 12. 8. 88  
43 Offenlegungstag: 22. 2. 90

51 Int. Cl. 5:  
C 12 N 5/00  
C 12 N 9/64  
B 01 D 81/00  
B 01 D 15/08

DE 3827477 A1

71 Anmelder:

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH  
(GBF), 3300 Braunschweig, DE

74 Vertreter:

Boeters, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Bauer, R.,  
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

72 Erfinder:

Friedl, Peter, Dr.; Engelmann, Katrin, Dr., 3300  
Braunschweig, DE

54 Verfahren zur Isolierung und zur alleinigen Züchtung von Endothelialzellen der menschlichen Hornhaut (HCEC)

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung sowie  
ein Verfahren zur alleinigen Züchtung von Endothelialzellen  
der menschlichen Hornhaut (HCEC).

DE 3827477 A1

Das Endothel der menschlichen Hornhaut besteht aus Zellen, die in vivo keine oder nur geringe Teilungsaktivität zeigen. Die optimale Dichte der Endothelialzellen ist jedoch Voraussetzung für die Funktionstüchtigkeit der Hornhaut und damit der Sehfähigkeit des Auges. Dadurch kommt dem Endothel in der Klinik bei Erkrankungen und Verletzungen der Hornhaut, bei Operationen am Auge und insbesondere bei Hornhauttransplantationen (Keratoplastiken) eine große Bedeutung zu, da sinkende Zelldichten des Endothels unbedingt vermieden werden müssen. Zudem wurde im letzten Jahrzehnt zunehmend deutlich, daß Zellen des gleichen Typs, nämlich corneale Endothelialzellen, die jedoch aus Rinderaugen isoliert wurden, eine große Bedeutung für die zellbiologische und biochemische Forschung erhalten haben, da diese Zellen eine sehr starke subendotheliale Matrix bilden, die auf andere Zellen einen stark wachstumsfördernden Effekt zeigt, wobei die Charakterisierung der Matrix erst teilweise gelungen ist; zum wachstumsfördernden Effekt vgl. beispielsweise J. Clin. Invest. 65 (1980) 1351.

Aus den vorstehenden Ausführungen ergibt sich, daß die Isolierung und Züchtung von Endothelialzellen der menschlichen Hornhaut ein großes Anliegen ist, dessen Realisierung erstmals 1979 beschrieben wurde, sich jedoch noch immer als äußerst schwierig erweist; vgl. Arch. Ophthalmol., 97 (1979) 1136. Insbesondere konnten bisher noch keine geeigneten Isolations- und Kulturbedingungen gefunden werden, die eine Vermehrung dieser Zellen über einen längeren Zeitraum in vitro ermöglichen. Weiterhin wurde die Etablierung von Zell-Reinkulturen durch die Koisolierung von fibroblasten-ähnlichen Zellen verhindert, die ein deutlich besseres Wachstum zeigen.

Da eine typische Eigenschaft cornealer Endothelialzellen in vivo ihre feste Anheftung auf Basalmembranen ist, erforderte die Isolierung der Zellen für die Etablierung von Primärkulturen bisher den Einsatz sehr drastischer Maßnahmen, beispielsweise eine mechanische Isolierung oder Einsatz hochkonzentrierter Enzymlösungen. Dadurch wird die Lebensfähigkeit der Zellen jedoch so herabgesetzt, daß eine Vermehrung in vitro nur in Ausnahmefällen möglich ist, nämlich bei Zellen, die von Hornhäuten junger Spender oder von Embryonen isoliert wurden; vgl. beispielsweise J. Cell. Sci., 66 (1984) 343.

Aufgabe der Erfindung ist es, den Stand der Technik zu verbessern. Diese Aufgabe wird gemäß einer Ausführungsform der Erfindung durch ein Verfahren zur Isolierung von Endothelialzellen der menschlichen Hornhaut (HCEC) gelöst, bei dem man die Hornhaut mit einer Collagenase-Lösung behandelt.

Man kann dabei mit einer Lösung einer Collagenase-Konzentration von 0,02 bis 0,5, vorzugsweise 0,01 bis 0,1 und insbesondere 0,04 bis 0,02% (Gewichtsbasis) 10 bis 30, vorzugsweise 15 bis 20 und insbesondere 16 bis 17 h lang behandeln.

Man kann aber auch zuerst mit einer Lösung einer Collagenase-Konzentration von 0,1 bis 1, vorzugsweise 0,2 bis 0,8 und insbesondere etwa 0,5% (Gewichtsbasis) 0,5 bis 2 und vorzugsweise etwa 1 h behandeln und danach zusätzlich eine vorstehend beschriebene Behandlung vorsehen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht erstmals die schonende Isolierung von Endothelialzellen. Nur die erfindungsgemäße Langzeitinkubation ermög-

licht die Isolierung einer genügenden Anzahl von Zellen (bis etwa 200 000 pro Hornhaut), um eine Primärkultur anlegen zu können. Außerdem bleibt durch die erfindungsgemäße Behandlung die Vitalität der Zellen erhalten, so daß erstmals eine mehrfache Subkultivierung der Zellen möglich wird.

Die Wahl der Collagenase stellt einen glücklichen Griff dar, da beispielsweise mit Trypsin die Lebens- und Proliferationsfähigkeit so stark vermindert wird, daß eine Subkultivierung kaum möglich ist (die Zellen zeigen stark verlängerte Generationszeiten) oder unmöglich wird.

Die Kontamination von Primärkulturen durch Fibroblasten ist ein bekanntes Problem der Zellzüchtung. Man kann diesem Problem dadurch begegnen, daß man Kulturmedien einsetzt, in denen die für das Wachstum von Fibroblasten essentielle Aminosäure L-Valin durch D-Valin ersetzt wird; vgl. beispielsweise Cell, 5 (1975) 11. Die Wirksamkeit dieses Kultursystems wird allerdings dadurch eingeschränkt, daß für die Züchtung von menschlichen Zellen Serum zugesetzt werden muß, das sowohl L-Valin als auch Wachstumsfaktoren enthält, die die Proliferation von Fibroblasten fördern, beispielsweise den Platelet-Derived-Growth-Factor.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird nun ein Verfahren zur alleinigen Züchtung von Endothelialzellen der menschlichen Hornhaut (HCEC) vorgesehen, bei dem man ein Medium, das unreinige Zellen (insbesondere Fibroblasten) eliminiert und frei von Fibroblasten-Proliferation fördernden Wachstumsfaktoren ist, mit einem Gehalt an Serum verwendet,

(a) aus dem L-Valin und

(b) die Wachstumsfaktoren entfernt worden sind. Beispiele sind Medien auf Basis von Ham-F12, Medium-199, MinimumEssential-Medium (MED), Iove's-Modified-MEM und/oder RPMI1640. Diese Medien bieten optimales Zellwachstum mit Zelldichten von 4 bis  $6 \times 10^4$  und Generationszeiten von 24 bis 50 h, wobei sich eine Mischung (1:1) von Ham-F12 mit Medium-199 als besonders geeignet erwies.

Beispielsweise kann man ein Medium mit einem Gehalt an Serum verwenden, aus dem L-Valin durch Dialyse entfernt worden und ggf. ein Großteil gleichzeitig entfernt niedermolekularer Substanzen durch Rückdialyse rückgeführt worden ist. Die Entfernung von L-Valin läßt sich beispielsweise durch mehrmalige Dialyse gegen Wasser und die Rückführung niedermolekularer Substanzen beispielsweise durch Rückdialyse gegen ein von L-Valin freies Medium erreichen.

Ferner kann man ein Medium mit einem Gehalt an Serum verwenden, aus dem die Wachstumsfaktoren durch Adsorption an einer Adsorbenssubstanz entfernt worden sind. Beispiele für derartige Adsorbensubstanzen sind die verschiedenen Chromatographiematerialien, wie Sephadex, wie Carboxymethyl-Sephadex (CM-Sephadex), beispielsweise Carboxymethyl-Sephadex-C50 (etwa vom pH 6,0, beispielsweise bei Pufferung mit Natriumphosphat). Die Verwendung von Medien mit einem Gehalt an erfindungsgemäß vorhandenen Seren reduziert die Wachstumsbedingungen für Fibroblasten so stark, daß diese Zellen nach 4 bis 6 Passagen aus den Endothelialzell-Kulturen eliminiert sind. Was die Teilungsaktivität der Endothelialzellen betrifft, so sind die erfindungsgemäß vorhandenen Seren in Konzentrationen von 10 bis 30 Gew.-% (auf Basis des Mediums) besonders förderlich.

Beispiele für Seren sind NCS, FCS und Humanseren,

wobei NCS/FCS-Gemische bevorzugt werden, beispielsweise in einer Menge von jeweils 7,5 Gew.-%. Auch Humanserum wirkt proliferationsfördernd, jedoch erweisen sich die beiden anderen Seren und deren Gemische bei der Begutachtung der Zellen nach morphologischen Kriterien als bevorzugt.

Weiterhin wird das Wachstum der Endothelialzellen durch Zugabe von Fibroblasten-Wachstumsfaktor, DMSO, Chondroitinsulfat, konditioniertem Tumorzellen-Medium (frei von L-Valin) und/oder Gentamycin gefördert. Als Fibroblasten-Wachstumsfaktor eignet sich beispielsweise eine Schweinehirn isolierte Fraktion mit einem Gehalt an Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), deren Optimum bei etwa 0,4 µg/ml Kulturmedium liegt; vgl. auch J. Biol. Chem., 253 (1978) 1222, DMSO kann beispielsweise in einer Menge von 0,004 Gew.-% zusetzen. Der Zusatz von Chondroitinsulfat zum Medium kann beispielsweise im Bereich von 0,03 bis 0,1 Gew.-% liegen. Bei dem konditionierten Tumorzellen-Medium kann es sich um ein Hepatoma-Zell-Medium in einer Menge von beispielsweise etwa 10 Gew.-% handeln.

Es hat sich gezeigt, daß sich nach vollständiger Eliminierung der Fibroblasten durch die Selektionierung und ferner ggf. klonale Aussaat der Endothelialzellen (4 bis 6 Passagen) die Kulturbedingungen durch einen Wechsel auf ein Medium mit einem Gehalt an L-Valin (gegebenfalls frei von D-Valin) noch weiter verbessern lassen. So läßt sich eine Langzeitkultivierung von mehr als 10 Passagen mit einer hohen Verdünnung der Zellen bei ihrer Aussaat erreichen.

Interessanterweise läßt sich die Endothelialzellen-Proliferation unter Ausbildung der typischen morphologischen Zellmerkmale noch weiter dadurch fördern, daß man die Kulturgefäße, die vorzugsweise aus Plastikmaterial bestehen, mit Substraten beschichtet, beispielsweise mit aus Basalmembranen von Zellen isolierten Substraten, beispielsweise Collagen (wie Typ IV), Laminin und/oder Chondroitinsulfat, beispielsweise durch ein Laminin/Chondroitinsulfat-Gemisch, beispielsweise in einer Menge von etwa 1 µg/500 µg/cm<sup>2</sup>.

Für die unter erfindungsgemäßen Bedingungen in vitro kultivierten Endothelialzellen lassen sich nach etwa 7 bis 8 Passagen Zellclotten entsprechend einer Zellmenge von 7 bis 10 x 10<sup>6</sup> Zellen (auf Basis einer einzigen Sponderhornhaut) erreichen.

Nachstehend wird die Erfindung durch Beispiele näher erläutert.

#### Beispiel 1: Isolierung von HCEC und Etablierung einer Primärkultur in einem Selektionsmedium

Die exzidierte Sponderhornhaut eines 45-jährigen Verstorbenen wird nach etwa zweiwöchiger Organkultur (MEM, angereichert mit 10% FCS und 1% Chondroitinsulfat; inkubiert bei 32°C) wie folgt präpariert. Die Hornhaut wird mit einer isotonischen Pufferlösung (beispielsweise PBS) abgespült und in ein Loch einer 24-Loch-Gewebekultur-Platte (Greiner) überführt, wobei die Endothelseite nach oben gerichtet ist. Auf das Endothel wird für 1 h eine 0,5-proz. Collagenase-Lösung in PBS gegeben; das Endothel der Hornhaut wird dann mit dem im folgenden näher spezifizierten Selektionsmedium mit einer 20ml-Spritze abgespült, die mit einer dünnen Kanüle (z.B. Nr. 14) versehen ist. Nach erneutem Spülen in PBS wird das Endothel nun für 16 bis 17 h mit einer 0,04-proz. Collagenase-Lösung behandelt und entsprechend den vorstehenden Angaben wiederholt mit

Medium gespült. Die nach jedem Spülen gewonnenen Zellen werden 5 min lang bei 800 bis 900 U/min abentrifugiert und geerntet, wonach man den Überstand absaugt und die Zellen in Selektionsmedium resuspendiert (F12/Isocove's-Modified-MEM-Gemisch (1:1) frei von L-Valin (= IF: Serumed), jeweils 7,5 Gew.-% dialysiertes und mit CM-Sephadex behandeltes NCS und FCS, 0,08 Gew.-% Chondroitinsulfat, 52,3 mg D-Valin/0,4 µl rohes FGF/ml, 50 µl Gentamycin/ml, 0,04 Gew.-% DMSO und 10 Gew.-% L-Valin freies konditioniertes Hepatoma-Zell-Medium). Die Zellen jedes Präparationschrittes werden in einem Loch (2 cm<sup>2</sup>) einer 24-Loch-Platte ausgesät. Die Platte wurde vorher mit einem Laminin/Chondroitinsulfat-Gemisch in Selektionsmedium (1 µg/500 µg/cm<sup>2</sup>) beschichtet, 0,5 h lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend einmal mit PBS gespült. Die Zellen werden in einem Kohlendioxidbrutschrank bei Kohlendioxidsättigung (5%) und 37°C inkubiert. Das Medium wird alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach vier bis fünf Tagen ist ein dichter, einschichtiger Zellrasen entstanden; die Primärkultur kann nun subkultiviert werden. Die ko-isolierten Fibroblasten wachsen unter den selektiven Kulturbedingungen nicht, wobei das Absterben dieser Zellen mikroskopisch verfolgt werden kann.

#### Beispiel 2: Gewinnung von Zellüberständen von HCEC

Es werden HCEC von in Organkultur gehaltenen Sponderhornhäuten gemäß Beispiel 1 isoliert und in Selektionsmedium kultiviert. Die Primärkulturen werden folgendermaßen subkultiviert. Das Medium wird von den Zellen abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gespült. Danach wird ein Film einer 0,05-proz. Trypsin-Lösung (mit 0,02% EDTA) auf die Zellen gegeben und nach einigen Sekunden abgesaugt. Man inkubiert 5 min lang, nimmt die abgelösten Zellen in 2 ml Selektionsmedium auf und sät erneut in einem beschichteten Kulturgefaß (10 cm<sup>2</sup>; 6-Loch-Platte; Greiner) aus. Nach Konfluenz der Zellen (3 bis 6 Tage) wird erneut subkultiviert; die Zellen werden in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:10 in neuen Kulturgefäßen ausgesät. Die Subkultivierung erfolgt bis zur vierten bis sechsten Passage in Selektionsmedium, danach wird auf normales L-Valin enthaltendes Wachstumsmedium umgestellt (M199/F12-bzw. M199/F99-Gemisch (1:1), angereichert mit 10% NCS, 0,08% Chondroitinsulfat, 0,4 µl FGF/ml und 50 µg Gentamycin/ml. Durch die beschriebene Subkultivierung kann man nach etwa 6 Passagen 3 bis 6 x 10<sup>7</sup> Zellen von einer einzigen Hornhaut isolieren. Diese Zellen werden in Wachstumsmedium in Kulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Nach Konfluenz der Zellen (3 bis 4 x 10<sup>6</sup> Zellen/Flasche) wird das Medium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit PBS gespült und serumfreies F99 (40 ml) auf die Zellen gegeben (angereichert mit 0,08 Gew.-% Chondroitinsulfat, 50 µg Gentamycin/ml und 5 µg Transferrin/ml). Die Zellen können so 48 bis 72 h serumfrei gehalten werden, bis die Überstände abgenommen, gesammelt und bei -20°C eingefroren werden. Diese Prozedur kann 4 bis 5 mal wiederholt werden, wenn die Zellen nach dem "Hungern" 4 bis 6 Tage lang erneut mit Wachstumsmedium inkubiert werden.

#### Abkürzungen:

HCEC humane corneale Endothelialzellen  
FCS fötales Kälberserum  
NCS Serum von frisch geborenem Kalb

FGF Fibroblasten-Wachstumsfaktor  
 DMSO Dimethylsulfoxid  
 F12 Ham-F12 (Medium)  
 M199 Medium 199  
 MEM Minimum-Essential-Medium  
 RPMI-1640 Medium RPMI-1640  
 PBS Phosphat-Pufferlösung  
 EDTA Ethyldiamintetraessigsäure

# Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Endothelialzellen der menschlichen Hornhaut (HCEC), dadurch gekennzeichnet, daß man die Hornhaut mit einer Collagenase-Lösung behandelt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man mit einer Lösung einer Collagenase-Konzentration von 0,002 bis 0,5, vorzugsweise 0,01 bis 0,1 und insbesondere 0,04 bis 0,2% (Gewichtsbasis) 10 bis 30, vorzugsweise 15 bis 20 und insbesondere 16 bis 17 h lang behandelt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man  
 (a) zuerst mit einer Lösung einer Collagenase-Konzentration von 0,1 bis 1, vorzugsweise 0,2 bis 0,8 und insbesondere etwa 0,5% (Gewichtsbasis) 0,5 bis 2 und vorzugsweise etwa 1 h lang behandelt und  
 (b) danach mit einer Collagenase-Lösung gemäß Anspruch 2 behandelt.
4. Verfahren zur alleinigen Züchtung von Endothelialzellen der menschlichen Hornhaut (HCEC), dadurch gekennzeichnet, daß man ein Medium, das verunreinigende Zellen (insbesondere Fibroblasten) eliminiert und frei von Fibroblasten-Proliferation fördernden Wachstumsfaktoren ist, mit einem Gehalt an Serum verwendet,  
 (a) aus dem L-Valin und  
 (b) die Wachstumsfaktoren entfernt worden sind.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Medium auf Basis von Ham-F12, Medium-199, Minimum-Essential-Medium (MEM), Iscove's-Modified-MEM und/oder RPMI-1640 verwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Medium mit einem Gehalt an Serum verwendet, aus dem L-Valin durch Dialyse entfernt worden ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Medium mit einem Gehalt an Serum verwendet, aus dem L-Valin durch Dialyse entfernt worden ist und ein Großteil gleichzeitig entfernter niedermolekularer Substanzen durch Rückdialyse rückgeführt worden ist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Medium mit einem Gehalt an Serum verwendet, aus dem die Wachstumsfaktoren gemäß Anspruch 4 durch Adsorption an einer Adsorbenssubstanz entfernt worden sind, beispielsweise einem Chromatographiematerial wie Sephadex und insbesondere CM-Sephadex-C50.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Medium mit einem Gehalt an gemäß Anspruch 5, 6 und/oder 7 behandeltem NCS, FCS und/oder Humanserum verwendet.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden An-

sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Medium mit einem zusätzlichen Gehalt an Fibroblasten-Wachstumsfaktor, DMSO, Chondroitinsulfat, konditioniertem Tumorzellen-Medium (frei von L-Valin) und/oder Gentamycin verwendet.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man nach Eliminierung verunreinigender Zellen in einem L-valinhaltigen Medium mit einem Gehalt an ggf. unbehandeltem Serum kultiviert.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man mit synthetischen oder aus natürlichem Material gewonnenen Substraten, beispielsweise mit aus Basalmatrizen von Zellen isolierten Substraten, wie Laminin, Collagen und/oder Chondroitinsulfat behandelte Kulturgefäße verwendet.